

UNIVERSIDAD DE PANAMA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGIA
PROGRAMA EN MAESTRIAS EN CIENCIAS BIOLOGICAS

MAESTRIAS EN CIENCIAS BIOLOGICAS CON ORIENTACION EN GENETICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR

DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL RECEPTOR DE FACTOR DE
CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR) EN PLASMA POR PCR EN TIEMPO REAL
EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO MÍCROCÍTICO (NSCLC).

ESTEFANI CRISTINA SANCHEZ CASTILLO

ASESOR DE TESIS:

DR. LUIS SOTILLO

TRABAJO DE GRADUACION
PARA OPTAR POR EL GRADO
ACADEMICO DE MAGISTER EN
CIENCIAS BIOLOGICAS CON
ORIENTACION EN GENETICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR

PANAMA, REPUBLICA DE PANAMA

2019

HOJA DE APROBACION

JURADO

FIRMA

DEDICATORIA

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi amado Hijo Sebastián Andrés

Por ser el motor en mi vida y la motivación día a día.

A mi madre Paulina

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero mas que nada, por su amor.

A mí querido Esposo Didio.

Por haberme apoyado en todo momento, y la motivación constante que me ha permitido llegar a esta otra meta más en mi vida.

A mi abuela Nina.

Por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero mas que nada, por su amor.

A mis familiares.

A mi hermana Melany por ser motivarme constantemente; a mi tía Janeth, a mi tía Anayansi, a mis primos Karen y Jaime por su apoyo constante.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Luis Sotillo, por confiar en mí y animarme a superarme constantemente. Sin sus correcciones, experiencia y consejo no hubiera sido posible la elaboración de esta tesis.

Al Dr. José Cedeño por su apoyo en la ejecución del procedimiento para finalizar este proyecto.

A Dr. Jhonny Galina, jefe del servicio de neumología del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid, por su ayuda para obtener los pacientes de este estudio.

A Dra. Lourdes Noriega, Dr. Tomás Perea, Dr. Raúl Jimenez, Dr. Leonis, Dra. Aguilera por su ayuda para obtener los pacientes para este estudio.

A Dr. Omar Castillo, Médico oncólogo por su asesoramiento para la culminación de este estudio

A mis compañeros de grupo de maestría del que con gran orgullo y satisfacción formo parte, no solo por su apreciada ayuda y motivación para culminar sino por ese sincero compañerismo.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
INDICE DE FIGURAS.....	VI
INDICE DE TABLAS.....	VII
ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN.....	XII
INTRODUCCION.....	XIII
JUSTIFICACION.....	XV
OBJETIVO.....	XVI
CAPITULO I	
REVISION LITERATURA.....	1
1.1 generalidades del cáncer de pulmón.....	1
1.2 características anatómicas.....	1
1.3 factores de riesgo.....	3

VI

1.3.1	tabaco.....	3
1.3.2	ocupación laborales.....	3
1.3.3	edad.....	4
1.3.4	sexo.....	4
1.3.5	factores genéticos.....	4
1.3.6	enfermedades benignas.....	4
1.4	Síntomas en el cáncer de pulmón	4
1.4.1	Tos.....	5
1.4.2	Hemoptisis.....	5
1.4.3	disnea.....	5
1.4.4	dolor torácico.....	5
1.4.5	disfonía.....	6
1.4.6	disfagia.....	6
1.5	Diagnostico.....	7
1.5.1	discriminación del riesgo.....	7
1.5.2	historia y examen físico.....	7
1.5.3	signos y síntomas respiratorios.....	7
1.5.4	pacientes asintomaticos con factores de riesgo.....	7
1.5.5	pacientes con sospecha radiológica.....	8
1.6	hallazgos radiológicos.....	9
1.7	examen de laboratorio.....	9
1.8	estudio patológico.....	9
1.8.1	carcinomas de células pequeñas o microcítico.....	10
1.8.2	adenocarcinoma.....	10

VII

1.8.3	carcinoma de células grandes.....	10
1.9	análisis genómico del cáncer de pulmón.....	11
1.10	EGFR generalidades.....	11
1.1.0.1	La vía MAPK.....	12
1.1.0.2	Cascada de señales.....	12
1.1.0.3	Inhibidores RAS.....	14
1.1.0.4	Inhibidores RAF.....	14
1.1.0.5	Inhibidores MEK.....	14
1.1.1	EGFR y el cáncer de pulmón.....	15
1.1.2	Importancia de la vía EGFR en el cáncer de pulmón no microcítico...16	
1.1.3	Mutaciones de EGFR y su localización cromosómica.....	16
1.1.4	Biopsia líquida.....	17
1.1.5	Determinación de mutaciones del EGFR por biopsia líquida.....	18

CAPITULO II

2.1	Metodología.....	21
2.2	Tamaño de la muestra.....	21
2.3	Tipo de muestra.....	21
2.4	Criterios de inclusión y exclusión.....	21
2.5	Protocolo para la extracción de ADN circulante.....	21
2.6	Detección de mutaciones de EGFR por PCR en tiempo final.....	25
2.7	Análisis de los datos de la valoración de las mutaciones.....	27

VIII

2.8 Análisis de control de la serie.....	29
--	----

CAPITULO III

3. Resultados.....	30
4. Discusión.....	35
5. Conclusión.....	36
6. Recomendaciones.....	37
7. Bibliografía.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Volumen del buffer ACL y del Carrier RNA requeridos para el procedimiento de muestras de 1ml, 2ml, 3ml.....	22
Tabla 2. Tiempos de descongelación, configuración de la PCR y temperaturas de almacenamiento.....	25
Tabla 3. Preparación de las mezclas maestras.....	26
Tabla 4. Disposición de los ensayos de control y mutaciones.....	26
Tabla 5. Intervalo de Ct aceptable para los controles de series.....	29

ÍNDICE DE IMAGENES

	Pág.
Imagen 1. Anatomía del sistema respiratorio.....	2
Imagen 2. Via MAPK.....	14
Imagen 3. Diferentes orígenes celulares del cfDNA.....	18
Imagen 4. Diferentes orígenes del ADN libre circulante y de donde se origina.....	19
Imagen 5. Configuración de normalización del análisis de EGFR.....	28

ABREVIATURAS

EGFR: Receptor de factor de crecimiento epidérmico

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

ADN: Acido desoxirribonucleico

HER1: receptor de factor de crecimiento epidérmico

ErbB1: receptor de factor de crecimiento epidérmico

HER2: receptor de factor de crecimiento epidérmico 2

HER3: receptor de factor de crecimiento epidérmico 3

HER4: receptor de factor de crecimiento epidérmico 4

TGF: factor de crecimiento tumoral

CPCNP: cáncer de pulmón de células no pequeñas

ALK: cinasa de linfoma anaplásico

ITK: Inhibidores tirosina quinasa

TK: tirosina quinasa

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos

Ras: Familia de genes que elaboran proteínas que participan en las vías de señalización celular que controlan la multiplicación y destrucción de las células

PI3K: Tipo de enzima que transmite señales en las células y que ayuda a controlar el crecimiento celular.

Akt: proteína serina-treonina cinasa.

mTOR : blanco farmacodinámico de la rapamicina

OPS: organización panamericana de la salud

PCR: reacción de la cadena de la polimerasa

TAQ: ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*

HEX: canal de visualización amarillo(fluoroforo)

FAM: canal de visualización verde(fluoresceína)

RT-PCR: PCR en tiempo real

RNAsa: ribonucleasa

RNA: ácido ribonucleico

RESUMEN

Se realizó un estudio de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico con el objetivo de determinar las mutaciones más frecuentes en el gen del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

Los pacientes con diagnóstico patológico confirmado se les tomó muestras de sangre total para obtener el plasma con EDTA para luego obtener ADN libre circulante mediante la técnica de extracción al vacío para después realizarles PCR en tiempo real.

Estos resultados se tabularon para determinar cuáles mutaciones tenían más frecuencia de acuerdo al sexo y hábito de fumar, en el cual obtuvimos 60 pacientes analizados, de los cuales 22(36,6%) resultaron positivos para algunas de las mutaciones, 6 pacientes resultaron positivos para una sola mutación para la delección en el exón 19(27.2%), 6 pacientes positivos en solamente para la sustitución en el exón 20(27.2%) y 6 pacientes positivos para una sola mutación en el exón 21(27.2%).

Adicional del total de 60 pacientes, 36 fueron pacientes femeninas y 24 pacientes masculinos, de los pacientes femeninos 15 resultaron positivos para alguna de las mutaciones (62.5%) y 21 pacientes femeninas sin mutación (58.3%); de los cuales tres (3) de ellas resultó positiva para doble de las mutaciones (sustitución de los exones 20 y 21) y una (1) de ellas también resultó positiva para doble mutaciones (mutación en el exón 19 y 20).

Por otra parte del total de 24 pacientes masculinos de los cuales 7 (29.1%) pacientes resultaron positivos para una de las mutaciones y 17 pacientes sin mutación (70.8%), cabe mencionar que para los pacientes masculinos no hubo doble mutaciones positivas.

Otro aspecto importante estudiado fue el de ser fumador o no, en el cual de los 60 pacientes estudiados 19(31.6%) eran fumadores y 41(68.3%) no fumadores, de los cuales de los fumadores 5 (26.3%) resultaron positivos para una mutación y 14 fumadores sin mutación. Adicional de los pacientes no fumadores hubo un total de 16(39.0%) positivos para las mutaciones y de ellos 4 (25%) con doble mutación.

En nuestro estudio encontramos una tendencia de pacientes positivos para mutaciones en el EGFR para cánceres de pulmón en los no fumadores y en las mujeres.

INTRODUCCION

El cáncer de pulmón es un tumor con mal pronóstico a pesar de los avances en el conocimiento de las enfermedades y en la aprobación de nuevos tratamientos en los últimos años. (Jemal, *et al.*, 2009).

Uno de las mayores revoluciones en el tratamiento de cáncer en general y del cáncer de pulmón en particular, ha sido la identificación de alteraciones moleculares (mutaciones, amplificaciones génicas) que son responsables de la supervivencia tumoral. El pronóstico de los pacientes cuyos tumores expresan estas alteraciones moleculares y son tratados con terapias específicas, es más favorable al de la población general de cáncer de pulmón. Una de estas dianas en el cáncer de pulmón es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). EGFR forma parte de una red de señalización que es componente central de varios procesos celulares críticos, como el crecimiento, la proliferación y la motilidad celulares. (shepherd, *et al.*, 2005)

EGFR es una de los cuatro miembros de la familia de receptores de membrana con actividad tirosina kinasa (TK) conocidos de forma global como ErbB (familia de receptores tirosina quinasa). La activación de este receptor supone tanto un beneficio de proliferación como un importante freno a la apoptosis, al estimular rutas oncogénicas como MAPK y PI3K/Akt/BPTEN/mTOR. (Paez, *et al.*, 2004)

En 2004 se descubrió por primera vez la existencia de mutaciones activadoras de EGFR en CPCNP, situadas en los exones 18-21, en la región codificante para el dominio intracitoplasmático TK del receptor, que producían una activación permanente de la vía de señalización mediada por EGFR (Pao, *et al.*, 2004)

De hecho aquellos tumores portadores de esta mutación parecían depender de su origen y evolución de esta vía oncogénica, por lo que fueron unos de los primeros tumores que se denominaron “adictos al oncogen” por esta dependencia. Como consecuencia de ello, la inhibición del crecimiento de estos tumores mediante agentes ITK de EGFR fue demostrada a nivel experimental como en la práctica clínica. (Cappuzzo, *et al.*, 2005)

Como se ha señalado previamente, las mutaciones activadoras de EGFR se localizan entre los exones 18 al 21 en la región codificante para el dominio TK del receptor. El 90% de estas mutaciones son pequeñas deleciones en el exón 19 (donde se localizan los codones 747-750), o mutaciones puntuales en los exones 18 y 20, por lo tanto las mutaciones de EGFR que se describen con más frecuencia son: en el exón 18 del EGFR: mutaciones E709 y G719, en el exón 19: deleciones de 9-, 12-, 15- y 24 bp(codones 746-753); o inserciones poco comunes de 15-bp y 18-bp(codones 743-753), en el exón 20: inserciones (codones

763-764, codones 767-774), S7681, T790M en el exón 21: L858R, T854 y las mutaciones L861Q y L861R. (Jemal, *et al.*, 2009)

Las mutaciones del exón 19 (pequeñas deleciones) son las que presentan mayor sensibilidad a los inhibidores de tirosina kinasa y hay mutaciones que ofrecen una resistencia de novo o adquirida a los mismos como las T790M, G719A y L861Q. La mutación L861Q da como resultado una sustitución de aminoácidos en la posición 861 en EGFR, desde una leucina (L) hasta una glutamina (Q). Esta mutación se produce dentro del exón 21, que codifica parte del dominio de la quinasa, y se produce con una frecuencia de aproximadamente el 2% en tumores de pulmón mutados por EGFR (Mitsudomi *et al.*, 2010).

Actualmente, diferentes guías clínicas y recomendaciones de expertos aconsejan identificar todas aquellas mutaciones individuales de EGFR que tienen una frecuencia mayor del 1% o superior. (Linderman, *et al.*, 2013)

La realización de los estudios en plasma aunque su sensibilidad dependerá de la cantidad de células circulantes que vendrán determinada en gran medida por el grado de afectación metastásicos.

JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION

El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) es una de las principales causas de muerte en el mundo, es por ello que se realiza estrategias con receptores moleculares para su tratamiento. En Panamá en el 2012 la morbilidad del cáncer de pulmón fue de 215 casos con una tasa de 1/6.1; mientras que la tasa de defunciones entre los años 2002-2012 para cáncer de pulmón en Panamá fue de 7.1 según el Instituto Nacional de Estadística y Censo de Panamá.

El impacto en el estudio será reflejado en la sobrevida de los pacientes ya que adicional que se mandaba estas muestras a realizarse en el extranjero, y el chequeo de estos pacientes cada cierto tiempo. La Prueba para la detección de mutaciones en el gen EGFR a pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, el realizarla en nuestro país permitirá que no se envíen estas pruebas al extranjero y se pueda hacer un seguimiento al tratamiento aquí en el país.

Cada muestra de los pacientes se le realizará la detección mediante PCR en tiempo real de la delección en el exón 19 y la sustitución de exones 20-21 (T790M y L858R) en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Este proyecto beneficiará a pacientes asegurados de la CSS, y dicho resultado le dará un oportuno diagnóstico si tiene alguna de las 3 mutaciones en el gen EGFR y así su tratamiento con inhibidores tirosina quinasa.

Los resultados de esta investigación se publicara en la revista científica de la caja de seguro social y participará en el concurso anual que realiza esta institución.

OBJETIVOS

Objetivo principal:

- ✓ Identificar las deleciones en el exón 19 y sustitución exones 20-21(T790M y L858R) en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico(EGFR) en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.

Objetivos específicos

- ✓ Determinar la frecuencia de las mutaciones en EGFR en pacientes mujeres con cáncer de pulmón no microcítico por PCR en tiempo real.
- ✓ Determinar la frecuencia de las mutaciones en EGFR en pacientes varones con cáncer de pulmón no microcítico por PCR en tiempo real.
- ✓ Determinar la frecuencia de las mutaciones en EGFR en pacientes no fumadores con cáncer de pulmón no microcítico por PCR en tiempo real.
- ✓ Determinar la frecuencia de las mutaciones en EGFR en pacientes fumadores con cáncer de pulmón no microcítico por PCR en tiempo real.

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Generalidades de los pulmones

Los pulmones humanos son estructuras anatómicas pertenecientes al aparato respiratorio, se ubican en la caja torácica, a ambos lados del mediastino. Debido al espacio ocupado por el corazón, el pulmón derecho es más grande que su homólogo izquierdo (figura 1). Poseen tres caras; mediastínica, costal y diafragmática, lo irrigan las arterias bronquiales y las arterias pulmonares le llevan sangre para su oxigenación. Embriológicamente deriva del endodermo. (OMS, 2003)

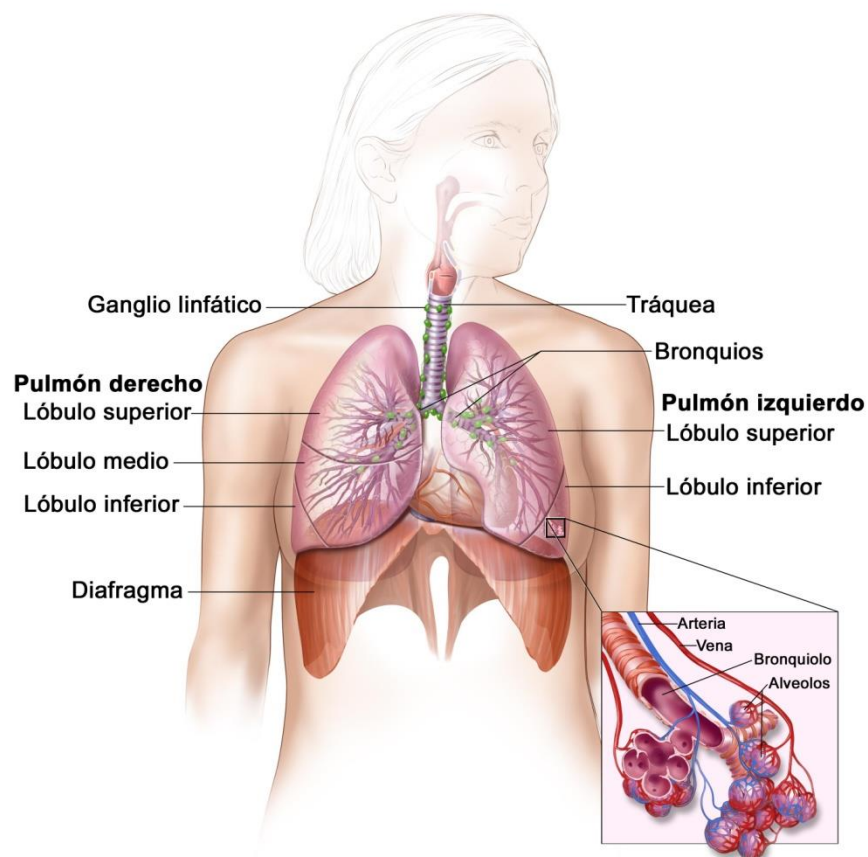


Figura 1: Anatomía del sistema respiratorio, tomado de <https://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR466537.jpg>

1.1 Generalidades cáncer de Pulmón:

El cáncer de pulmón es el más frecuente del mundo con aproximadamente 1.400.000 nuevos casos al año. Representa el 16,6% de todos los tumores entre los hombres (965.000) y el 7,6% entre las mujeres (387.000 casos). Las mayores incidencias se observan en Europa (sobre todo en el Este y en el Sur) y en Norteamérica. En mujeres, las incidencias más elevadas dentro de Europa se registran en los países del Norte.

La relación entre sexos es de 2,5 hombres por cada mujer en el mundo, Costa Rica (cada 2 pacientes con cáncer de pulmón del sexo masculino, hay una del sexo femenino). Según la Organización mundial de la salud la tendencia de la incidencia y mortalidad por cáncer de pulmón tanto en hombres como en mujeres es hacia la disminución de las tasas; sin embargo, es la tercera causa de mortalidad por cáncer en hombres y la quinta en mujeres. (OMS, 2003)

1.2 Características anatómicas

Los pulmones corresponden a una de los órganos mas importantes en nuestro cuerpo, conformado por múltiples partes El Cáncer de Pulmón de Células no microcítico surge de las células epiteliales pulmonares desde los bronquios principales hasta los alvéolos terminales. El tipo histológico de CPCNP se correlaciona con el sitio de origen, reflejando una variación en el epitelio del tracto respiratorio desde los bronquios hasta los alvéolos. Por lo general, el carcinoma de células escamosas se inicia cerca de un bronquio principal. El adenocarcinoma y el carcinoma bronquioalveolar habitualmente se originan en el tejido periférico del pulmón. (NIH, 2017)

El factor etiológico fundamental para padecer un cáncer de pulmón es el tabaco, de manera que se ha observado claramente una tendencia descendente en la incidencia (y en la mortalidad) en los países donde se ha disminuido el número de fumadores.

El tipo tumoral más frecuente entre los hombres es el carcinoma escamoso, mientras que en las mujeres es el adenocarcinoma, lo que puede ser un reflejo de los distintos mecanismos de carcinogénesis en ambos sexos. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 55 y los 75 años, con un máximo entre los 65 y los 70, aunque se registran casos desde los 35-40 años. (OPS, 2010)

1.3 Factores de riesgo

Se conocen diversos factores que tienen relación con el cáncer de pulmón. Entre ellos destacan:

1.3.1 Tabaco: entre el 80-90% de los cánceres de pulmón se dan en fumadores, o en personas que hayan dejado de fumar recientemente, pero no hay evidencia concreta de que fumar esté asociado a una variedad histológica específica, aunque tiende a relacionarse más con el carcinoma epidermoide y con el cáncer de células pequeñas, y menos frecuentemente con el adenocarcinoma. Los fumadores tienen un riesgo de 10 a 20 veces mayor de desarrollar cáncer de pulmón (según el número de cigarrillos fumados al día) que los no fumadores. La utilización de tabaco ligero no varía el riesgo de padecer la enfermedad. Los fumadores pasivos también tienen aumentado el riesgo de desarrollar cáncer pulmonar. En términos generales, es similar al de los fumadores de uno a dos cigarrillos al día. De los componentes del humo de tabaco destacan como agentes

cancerígenos los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Dejar de fumar disminuye el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, de manera que al cabo de 15 años se aproxima al de los no fumadores. Este descenso depende sobre todo del tiempo de consumo. (OPS, 2010)

1.3.2 Ocupaciones laborales: los trabajadores en contacto con asbesto (aislamientos, minería, industria textil), petróleo y sus derivados, presentan unas mayores cifras de cáncer de pulmón. También se ha correlacionado con la exposición al níquel y al radón. (OPS, 2010)

1.3.3 Edad: como en la mayoría de los tumores, el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón aumenta con la edad. (OPS, 2010)

1.3.4 Sexo: los hombres poseen una tasa de cáncer de pulmón entre dos y tres veces mayor que las mujeres. (OPS, 2010)

1.3.5 Factores genéticos: el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón se multiplica por cuatro cuando hay antecedentes familiares de la enfermedad. (OPS, 2010)

1.3.6 Enfermedades benignas: los pacientes diagnosticados de EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica) presentan un mayor riesgo de desarrollar cáncer pulmonar. También se ha correlacionado con la fibrosis pulmonar idiopática o con la esclerodermia. (OPS, 2010)

1.4 Síntomas en el cáncer de pulmón:

El cáncer de pulmón se puede presentar con síntomas o descubrirse de manera incidental en una radiografía de tórax. Los signos y síntomas pueden ser el resultado de la ubicación, de la invasión local primaria o por compresión de las estructuras torácicas

adyacentes, metástasis a distancia o fenómenos paraneoplásicos. Los síntomas más comunes son la tos o el dolor torácico que tiende a empeorar. Otros síntomas incluyen: hemoptisis, pérdida de peso, disnea, irritación de la garganta. Algunos síntomas pueden ser por compresiones del esófago y causan disfagia, de los nervios de la laringe que ocasionan irritación de garganta o las que comprometen la vena cava superior que causan edema facial y distensión de las venas superficiales de la cabeza, el cuello y tórax. (OPS, 2010)

En fases precoces de la enfermedad, el cáncer de pulmón no produce ningún tipo de síntomas o son muy inespecíficos. El diagnóstico en esta fase es generalmente accidental, es decir, se diagnostica por pruebas que se realizan para descubrir otros problemas de salud. En la mayor parte de las ocasiones, el cáncer de pulmón se diagnostica cuando los síntomas obligan al paciente a acudir al médico. Debido al hecho de que los síntomas son tardíos, con frecuencia el cáncer de pulmón se diagnostica en etapas avanzadas. (OPS, 2010)

Los síntomas dependen de la localización y extensión del tumor.

Los más frecuentes son:

1.4.1 Tos: es el síntoma más frecuente. Se produce por irritación bronquial.

Con frecuencia se acompaña de expectoración. Es característico de los tumores que se localizan en la zona central de los pulmones. En aquellos pacientes, generalmente fumadores que ya presentaban tos como consecuencia de problemas respiratorios, lo que se produce es un aumento o exacerbación de este síntoma. (OPS, 2010)

1.4.2 Hemoptisis: que es la expectoración de sangre proveniente de alguna lesión en el pulmón en muchas ocasiones el que le lleva a acudir al médico. (OPS, 2010)

1.4.3 Disnea: el paciente comienza a notar sensación de falta de aire, que le impide cada vez más realizar cualquier esfuerzo como subir escaleras. Es más frecuente en los tumores localizados en la zona central de los pulmones. (OPS, 2010)

1.4.4 Dolor torácico: el dolor se produce cuando el tumor afecta a la pared torácica o la pleura. Suele ser característico de los tumores situados en la zona más periférica de los pulmones. (OPS, 2010)

Otros síntomas:

1.4.5 Disfonía: en ocasiones el paciente nota cambios en la voz. Este síntoma se produce cuando el tumor se extiende al mediastino, y afecta al nervio recurrente que es el que mueve las cuerdas vocales. (OPS, 2010)

1.4.6 Disfagia: el paciente tiene la sensación de que la comida se le queda detenida en la mitad del tórax. Se produce cuando el tumor o los ganglios afectados comprimen el esófago.

En los casos de enfermedad avanzada el paciente presenta síntomas como: pérdida de apetito, decaimiento general, dolores de huesos, cansancio, debilidad, confusión, mareos o pérdida de peso. (NIH, 2017)

Los síntomas por metástasis a distancia pueden incluir alteraciones neurológicas y cambios en la personalidad por metástasis cerebral o dolor debido a metástasis óseas. Poco frecuente son las manifestaciones y señales de síndromes paraneoplásicos, osteoartropatía con hipocratismo digital e hipercalcemia a partir de proteínas relacionas

con la hormona paratiroidea. También pueden encontrarse linfadenopatías supraclaviculares agrandadas, derrame pleural o colapso lobar, neumonía de lenta resolución o signos relacionados con enfermedades tales como el EPOC o la fibrosis pulmonar. (NIH, 2017)

Cuando se presenta sintomatología y signos altamente sospechosos por cáncer de pulmón, se debe referir al paciente para la investigación, confirmación histológica y determinación de la extensión de la enfermedad sin retrasarse a un Servicio de Neumología o de Cirugía de Tórax, ya que el retraso en los estudios de gabinete y la obtención de las biopsias o citología producirá generalmente progresión del estadiaje y deterioro funcional del paciente que no permite el tratamiento. (NIH, 2017)

1.5 Diagnóstico

Toda persona adulta que consulte se debe evaluar de forma integrada, principalmente los que puedan estar en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón.

La evaluación consiste en:

1.5.1 Discriminación del riesgo

Antecedentes del paciente: Edad mayor o igual a 50 años, historia de consumo de tabaco: años de fumado y cantidad de consumo de cigarrillos por día, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), exposición asbesto, historia de cáncer de cabeza y cuello.

1.5.2 Historia y examen físico: Signos y síntomas sistémicos: fiebre, debilidad, dedos hipocráticos, pérdida de peso en los últimos 6 meses, sintomatología de obstrucción de vena cava superior, disfagia, dolor óseo, dolor en hombro, presencia de ganglios supraclaviculares o cervicales.

1.5.3 Signos y síntomas respiratorios: Tos con o sin hemoptisis, disnea, dolor torácico, estridor.

1.5.4 Pacientes asintomáticos con factores de riesgo

Se debe referir el paciente que cumpla con al menos dos de los factores de riesgo y uno o más síntomas:

1. Factores de Riesgo

- a. Paciente igual o mayor a 50 años.
- b. Historia de tabaquismo de alto consumo: 20 o más paquetes-año, suspendido el tabaquismo en un período menor a 15 años.
- c. Alguno de estos antecedentes:
 - i. EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica)
 - ii. Exposición ocupacional o ambiental a sustancias asociadas a riesgo de cáncer de Pulmón: ej: asbesto, arsénico, berilio, etc.
 - iii. Paciente con historia de cáncer de pulmón previo
 - iv. Exposición a radioterapia torácica hace más de 10 años

2. Síntomas y Signos presentes por más de 3 semanas sin causa definida

- a. Tos persistente
- b. Dolor torácico
- c. Disnea
- d. Hemoptisis
- e. Pacientes con pérdida de peso significativa
- f. Hipocratismo digital
- g. Disfonía
- h. Linfadenopatía cervical o supraclavicular

- i. Estridor
- j. Síndrome de obstrucción de vena cava superior
- k. Signos sugestivos de metástasis (cerebro, huesos, hígado o piel)

Pacientes con sospecha radiológica

Se deben referir a los pacientes que presenten:

1. Paciente con nódulo pulmonar sospechoso de malignidad según criterio de radiólogo
2. Otros hallazgos radiológicos. (con o sin reporte)
 - a. Nódulo(s) mayor o igual a 1 cm
 - b. Masa pulmonar (mayor de 3 cm)
 - c. Ensanchamiento mediastinal de origen no vascular (aorta y vasos pulmonares)
 - d. Derrame pleural
 - e. Consolidaciones de lenta resolución (8 o más semanas)

1.5.5 Hallazgos radiológicos

Radiografía de tórax con hallazgos de nódulo o masa pulmonar, consolidación de lenta resolución y derrame pleural.

Se definen dos grupos de pacientes: Pacientes sintomáticos con factores de riesgo y los pacientes que por alguna razón se les realizó una radiografía de tórax y tienen hallazgos

1.6 Examen de laboratorio

Se debe realizar estudios por Tuberculosis, este examen es obligatorio para la referencia de paciente sospechoso por cáncer de pulmón, con el fin de acortar los tiempos en el proceso diagnóstico.

1.7 Estudio Patológico

Todo cáncer de pulmón debe ser estudiado y clasificado, según esta y el estado funcional y la valoración clínico del paciente se podrá definir si el abordaje es quirúrgico, si requiere quimioterapia, radioterapia, cuidados paliativos o una combinación de lo anterior.

Los distintos tipos histológicos tienen diferente evolución natural y, por tanto, como paso previo al tratamiento, es necesario un diagnóstico histológico preciso realizado por un patólogo experto. Las principales decisiones con respecto al tratamiento se toman al distinguir claramente los carcinomas de célula pequeña y los que no corresponden a este tipo (subclasificados a su vez en diferentes tipos histológicos). (OPS, 2010)

Las formas más comunes de cáncer de pulmón reciben nombres que dependen de las características de las células de las cuales derivan, distinguiéndose dos grandes grupos:

1.8.1 Carcinomas de células pequeñas o microcítico: Su nombre deriva del tamaño de sus células (microcítico: células muy pequeñas), un 20% de los cánceres de pulmón son de este tipo. Se localiza preferentemente en la zona central de los pulmones, pudiendo comprimir vasos u órganos localizados en ese nivel (vena cava, etc.). Se caracterizan por su alta agresividad y crecimiento rápido.

1.8.2 Carcinomas no microcítico(NSCLC): representan el 80% restante de los cánceres de pulmón. Los tipos más frecuentes son:

1.8.2.1 Carcinoma escamoso o epidermoide: Suele localizarse en la parte central de los pulmones, y con frecuencia se necrosa en su interior y se asemeja a un absceso. Tiene un crecimiento relativamente lento.

1.8.2.2 Adenocarcinoma: Es el menos relacionado con el consumo de tabaco, pero aún así es más frecuente en fumadores. Suele aparecer más entre las mujeres y localizarse en zonas más periféricas de los pulmones, por lo que frecuentemente afecta a la pleura y pared torácica.

1.8.2.3 Carcinoma de células grandes: Se denomina así por el tamaño de las células que lo componen. Es el tipo menos frecuente de los carcinomas broncopulmonar. (OPS, 2010)

1.9 Análisis genómico del cáncer de pulmón

La identificación de mutaciones en el cáncer de pulmón llevó a formular la terapia molecular dirigida para mejorar la supervivencia de subgrupos de pacientes con enfermedad metastásica. En particular, ahora es posible definir subgrupos de adenocarcinoma por mutaciones específicas en los genes que codifican componentes del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), así como las vías de transducción de señales de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) secuencia abajo y de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). Estas mutaciones pueden definir los mecanismos de sensibilidad a los fármacos, y la resistencia primaria o adquirida a los inhibidores de la cinasa. Otras anomalías genéticas de posible importancia para las decisiones con respecto al tratamiento incluyen traslocaciones que involucran la cinasa del linfoma anaplásico (ALK) receptor de la tirosina cinasa, que son sensibles a los inhibidores ALK y una amplificación del *MET* (factor de transición epitelio-mesenquimatoso), que codifica el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos. La amplificación del *MET* se relacionó con resistencia secundaria a los inhibidores de la tirosina cinasa del EGFR. (NIH, 2017)

1.10 EGFR: Generalidades

El EGFR es una glicoproteína transmembrana ubicua compuesta por un dominio extracelular amino-terminal para la unión de ligandos, una hélice transmembrana hidrófoba y un dominio citoplasmático que contiene el dominio tirosina quinasa y una región carboxi-terminal que contiene residuos de tirosina y elementos reguladores del receptor. El EGFR pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa, y está representado por 4 miembros (HER1 o EGFR, HER2, HER3 y HER4), cuyos ligandos son un grupo de factores de crecimiento en especial el EGF y TGF alfa. El EGFR es activado por dimerización, la cual depende de la unión del ligando, aunque también puede ocurrir cuando hay sobreexpresión y alteraciones estructurales del receptor. (Qiu et al., 2015)

1.1.0.1 Las vía MAPK

De todas las proteínas implicadas en la señalización mitogénica, la familia de las MAPKs (mitogen-activated protein kinases) es una de las más estudiadas.

Esta familia de serina-treonina quinasas cuenta actualmente con cuatro subfamilias

ERKs(extracelular signal-regulated kinases)

SAPK/JNKs(stress-activated protein kinase/ JUN N-terminal kinases

MAPK p38/RK /CSBP (p38)

ERK5/BMK (BIG MAP kinase-1)

La vía MAPK se inicia cuando un factor de crecimiento se une a un receptor de tirosina quinasa localizado en la membrana plasmática, induce su dimerización, fosforilación y la unión a proteínas adaptadoras que tienen dominios SH2 como GRB2, SHC y SHP2.

Estas proteínas atraen a SOS1 hacia la membrana plasmática y SOS1 es el mayor GEF conocido y se une a RAS GDP para promover el intercambio a su forma activa como RAS GTP. En su forma activa RAS actúa sobre diversas vías de señalización celular, siendo la mas importante RAS/MAPK(cascada RAF-MEK-ERK), la principal efectora es RAF una serina-treonina quinasa que tiene 3 isoformas(ARAF-BRAF-RAF1) de los cuales BRAF es la mas efectiva. RAF inicia la cascada de quinasas MEK-ERK y ERK es el ultimo efector de la via y acta sobre moléculas citosolicas y nucleares como factores de transcripción, proteínas de membrana y quinasas proteicas. (Hancock, 2003)

El resultado final es un cambio en el patrón de expresión genética que estimula la proliferación, supervivencia y diferenciación celular, esta interacción finaliza cuando se produce la hidrólisis de GTP a GDP por medio de la actividad GTPasa intrínseca de Ras, que se incrementa notablemente por medio de GAPs.

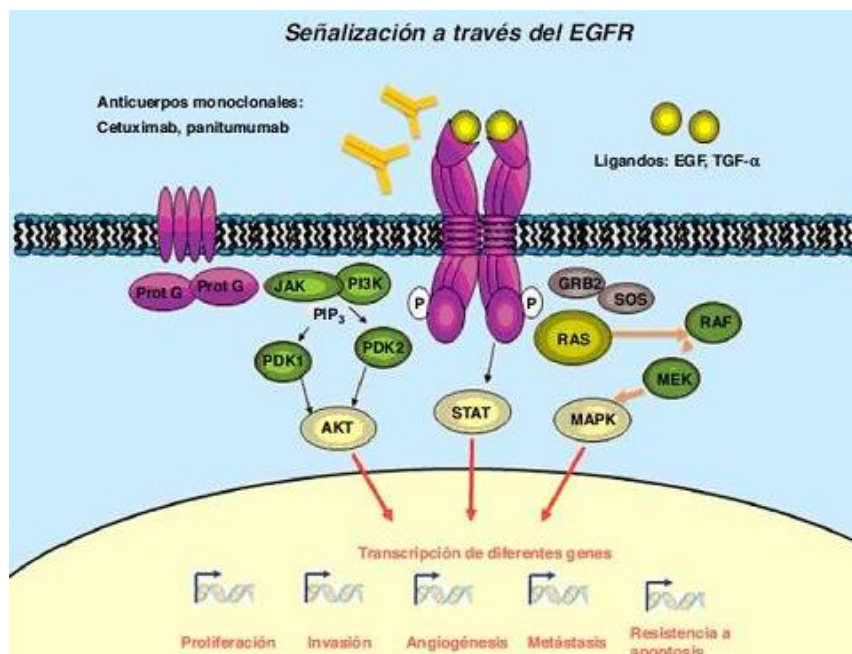


Figura 2. Vía MAPK. Tomada de: (Hancock, 2003)

1.10.2 Inhibidores RAS

Debido a su condición de oncogen más frecuente en los tumores humanos, Ras ha sido el mas importante en la búsqueda de agentes antitumorales debido a que conlleva la pérdida de su sensibilidad hacia las proteínas GAPs (proteína aceleradora de la actividad GTPasa) y, en consecuencia, su bloqueo en la forma unida a GTP. Los esfuerzos iniciales fueron encaminados, bien a restituir la actividad GTPasa intrínseca de Ras mediante la simulación de los efectos de las GAPs, o bien a antagonizar la unión a GTP. Sin embargo, hasta la fecha, ambas estrategias han sido absolutamente infructuosas. No obstante, Ras ha seguido siendo la diana de intentos de bloqueo alternativos, esta vez dirigidos contra los mecanismos mediante los cuales Ras se inserta en las membranas, requisito indispensable para que Ras pueda ser activa. (Hancock, 2003)

1.10.3 Inhibidores RAF.

Distintas clases de compuestos han sido desarrollados como potenciales inhibidores de esta familia de kinasas. Algunos intentos han perseguido el inhibir la expresión de c-Raf, como el inhibidor antisentido. (Hancock, 2003)

1.10.4 Inhibidores MEK

Las kinasas duales MEK1 y MEK2, son los únicos sustratos conocidos de las kinasas de la familia Raf y, a su vez, son las únicas kinasas activadoras de las MAP kinasas ERKs. Debido a esto, han atraído gran atención como objetivos terapéuticos para inhibir la activación de la ruta. Al contrario que la mayoría de los inhibidores de kinasas, los inhibidores de MEK no son competidores de ATP. Su mecanismo de acción reside en su capacidad de unirse a MEK y bloquearla en estado catalíticamente inactivo, por lo que

son altamente específicos, ya que las secuencias a las que se unen son únicas para esta familia de kinasas. (Hancock, 2003)

1.11 EGFR y el Cáncer de Pulmón

El EGFR tiene un papel fundamental en el desarrollo tumoral en el que se han encontrado diferentes mutaciones que se correlacionan con un peor pronóstico. En consecuencia, constituye una diana en la terapia de cáncer, mediante anticuerpos monoclonales e inhibidores de la actividad tirosina quinasa (Xu *et al.*, 2012).

EGFR es una de los cuatro miembros de la familia de receptores de membrana con actividad tirosina kinasa (TK). La activación de este receptor supone tanto un beneficio de proliferación como un importante freno a la apoptosis, al estimular rutas oncogénicas como MAPK y PI3K/Akt/BPTEN/mTOR (Paez *et al.*, 2004).

En 2004 se descubrió por primera vez la existencia de mutaciones activadoras de EGFR en CPCNP, situadas en los exones 18-21, en la región codificante para el dominio intracitoplasmático TK del receptor, que producían una activación permanente de la vía de señalización mediada por EGFR (Alberg *et al.*, 2013).

De hecho aquellos tumores portadores de esta mutación parecían depender de su origen y evolución de esta vía oncogénica, por lo que fueron unos de los primeros tumores que se denominaron “adictos al oncogen” por esta dependencia. Como consecuencia de ello, la inhibición del crecimiento de estos tumores mediante agentes ITK de EGFR fue demostrada a nivel experimental como en la práctica clínica (Cappuzzo *et al.*, 2005).

1.12 Importancia de la vía EGFR en el Cáncer de Pulmón No Múrcocítico (CPNM)

El cáncer de pulmón es un tumor con mal pronóstico a pesar de los avances en el conocimiento de las enfermedades y en la aprobación de nuevos tratamientos en los últimos años (Nishio *et al.*, 2016).

El cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPNM) avanzado portadores de mutaciones de EGFR o reordenamiento de ALK han demostrado: un comportamiento y una evolución clínica diferente al CPNM convencional una respuesta elevada a los inhibidores tirosina kinasa (ITK) específicos que produce un aumento de la supervivencia libre de progresión y aumento en la supervivencia (Zhao *et al.*, 2016).

Uno de las mayores revoluciones en el tratamiento de cáncer en general y del cáncer de pulmón en particular, ha sido la identificación de alteraciones moleculares (mutaciones, amplificaciones génicas) que son responsables de la supervivencia tumoral, el pronóstico de los pacientes cuyos tumores expresan estas alteraciones moleculares y son tratados con terapias específicas, es más favorable al de la población general de cáncer de pulmón (Tseng *et al.*, 2014).

Una de estas dianas en el cáncer de pulmón es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), EGFR forma parte de una red de señalización que es componente central de varios procesos celulares críticos, como el crecimiento, la proliferación y la motilidad celulares.(Duan *et al.*, 2015)

1.13 Mutaciones de EGFR y su localización cromosómica

Como se ha señalado previamente, las mutaciones activadoras de EGFR se localizan entre los exones 18 al 21 en la región codificante para el dominio TK del receptor. El 90% de

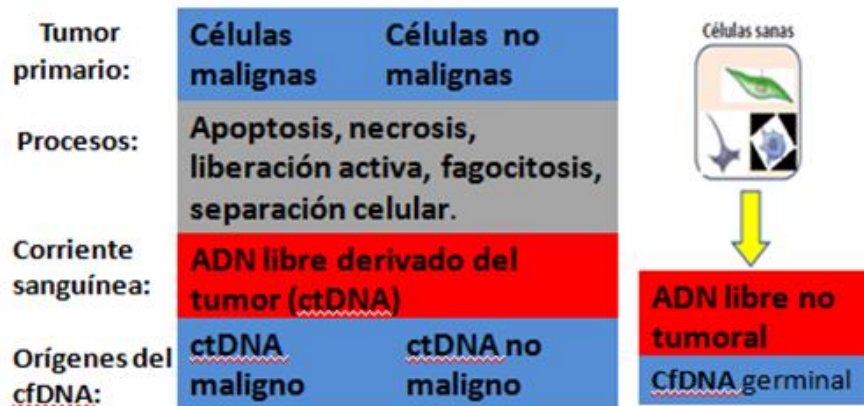
estas mutaciones son pequeñas deleciones en el exón 19 (donde se localizan los codones 747-750), o mutaciones puntuales en los exones 18 y 20. Por lo tanto las mutaciones de EGFR que se describen con más frecuencia son: en el exón 18 del EGFR: mutaciones E709 y G719. En el exón 19: deleciones de 9- , 12-, 15- y 24 bp(codones 746-753); o inserciones poco comunes de 15-bp y 18-bp(codones 743-753). En el exón 20: inserciones(codones 763-764, codones 767-774), S768L, T790M en el exón 21: L858R, T854 y las mutaciones L861Q y L861R (García-Foncillas *et al.*, 2011).

Las mutaciones del exón 19 (pequeñas deleciones) son las que presentan mayor sensibilidad a los inhibidores de tirosina quinasa y hay mutaciones que ofrecen una resistencia de novo o adquirida a los mismos como las T790M, G719A y L861Q. Actualmente, diferentes guías clínicas y recomendaciones de expertos aconsejan identificar todas aquellas mutaciones individuales de EGFR que tienen una frecuencia mayor del 1% o superior (García-Foncillas *et al.*, 2011).

1.14 Biopsia líquida

Esta es una técnica que permite estudiar los tumores a través del análisis de sangre, permite obtener mediante técnica de extracciones moleculares ADN libre del tumor, así es representativa de todo el tejido tumoral (figura 3).

FIGURA 3. DIFERENTES ORIGENES CELULARES DEL cfDNA



En las terapias dirigidas contra el cáncer se utilizan fármacos que bloquean el crecimiento del cáncer al interferir en moléculas específicas que participan en la progresión de la enfermedad. Las terapias dirigidas actúan en dianas moleculares específicas de las células cancerosas a diferencia de las quimioterapias regulares, que actúan inespecíficamente en todas las células que crecen. Un paciente será candidato a terapia dirigida si se encuentra una diana apropiada, si se trata de un tumor sólido.

ADN circulante son fragmentos de ácido desoxirribonucleico que se encuentran fuera del espacio intracelular. Estos fragmentos son en realidad desechos celulares provenientes de la apoptosis o muerte celular, su localización será, por tanto, los espacios extracelulares y está disponible para su análisis gracias a las biopsias líquidas.

Aunque en este artículo nos centraremos en el ADN, es lógico deducir que podemos hablar mejor de ácidos nucleídos circulantes: también se pueden encontrar distintas moléculas de ARN.

Tipos de ADN circulante

Puede tener dos naturalezas:

1. ADN circulante normal: perteneciente a fragmentos de células normales.
2. ADN circulante tumoral: perteneciente a fragmentos de células tumorales.

Se puede incluir en el ADN circulante normal el ADN circulante fetal, que se utiliza para ciertas pruebas prenatales actuales y que están tomando peso en muchos laboratorios de análisis(figura 4)

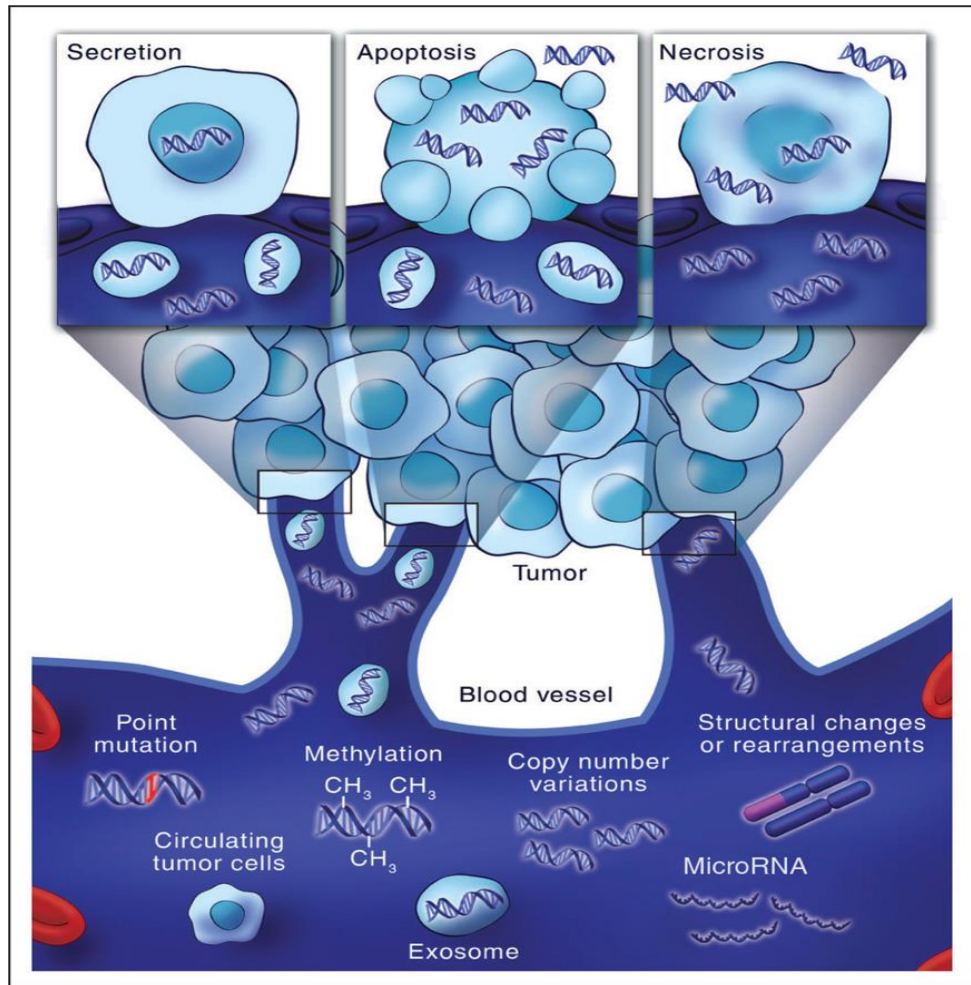


Figura 4. Diferentes orígenes del ADN libre circulante y de donde se origina.

Tomado de: Linderman et al, 2013

Recientemente el uso de extracción de ADN libre circulante es lo que nos ha permitido el avance en esta nueva tendencia de biopsia líquida, una de ellas es el sistema de extracción al vacío que nos permite captar muestras de ADN libre circulantes en pequeñas cantidades.

1.15 Determinación de mutaciones del EGFR por Biopsia líquida

En la actualidad existen diversas técnicas de laboratorio que permiten el análisis de mutaciones en el gen EGFR, si bien la mayoría de ellas se centran en procesos basados en la amplificación del ADN utilizando PCR.

En la mayoría de laboratorios donde actualmente se realizan las determinaciones del EGFR, las técnicas utilizadas son las siguientes: secuenciación automática, Scorpion Amplification refractory Mutation System(SARMS), PNA-LNA clamp y pirosecuenciación.

La técnica que utilizaremos en este estudio es Scorpion Amplification Refractory Mutation System (SARMS)

Se basa en la combinación de dos técnicas: las sondas Scorpions y una amplificación refractaria para la detección de mutaciones. El procedimiento de laboratorio requiere un equipo de PCR capaz de detectar en tiempo real la reacción con PCR en función de la fluorescencia que se va generando en cada ciclo con el uso de sondas fluorescentes. Esta técnica tiene la ventaja de su alta sensibilidad (2-5% según las series y las mutaciones que detectar. Precisa un equipo de PCR en tiempo real. Esta técnica permite solamente detectar las mutaciones específicas.

2.1 METODOLOGÍA

2.1.1 Tamaño de la muestra: 60 muestras de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.

2.1.2 Tipo de muestra: se analizó plasma obtenido de sangre total en tubos con EDTA.

2.1.3 Criterios de inclusión: pacientes con biopsia de patología positiva para cáncer de pulmón no microcítico.

2.1.4 Criterios de exclusión: pacientes que no posean diagnóstico de biopsia de patología positiva para cáncer de pulmón no microcítico.

2.2 PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍDOS CIRCULANTES EN PLASMA

Se extrajeron 15 ml de Sangre, luego los tubos fueron centrifugados a 3000 rpm por 10 min a 4 grados centígrados, y luego a 5000 rpm por 10 min a 4 grados centígrados.

Luego de tener separado el plasma se almacena a -20°C hasta el momento de su uso.

El ADN se extrajo a partir de plasma utilizando el kit QIAamp® Circulating Nucleic Acid (QIAGEN) de acuerdo al procedimiento descrito por el fabricante.

La extracción se realizó con el equipo de vacío QIAVAC 24 plus® QIAGEN® también de acuerdo al procedimiento descrito por el fabricante.

2.3 DETECCIÓN DE MUTACIONES DE EGFR POR PCR EN TIEMPO REAL

Las mutaciones en los genes de EGFR fueron determinadas mediante la tecnología Scorpion Amplification Refractory Mutation System (SARMS). Esta tecnología combina el PCR en tiempo real con los primers Scorpion de los cuales son primers bifuncionales que están unidos covalentemente al primer.

Las reacciones de amplificación se realizaron con el kit EGFR RGQ PCR Therascreen (QIAGEN) de acuerdo al procedimiento descrito por el fabricante.

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron en un Rotor Gene de la marca QIAGEN®

Se realizaron las diferentes mezclas madres, descritas a continuación, tabla 1

ENSAYO	TUBO PARA MEZCLA DE REACCION	VOLUMEN DE MEZCLA DE REACCION	VOLUMEN DE Taq ADN POLIMERASA
CONTROL	CTRL	19,50 µl x (n + 1)	0,50 µl x (n+1)
T790M	T790M	19,50 µl x (n + 1)	0,50 µl x (n+1)
Deleciones	Del	19,50 µl x (n + 1)	0,50 µl x (n+1)
L858R	L858R	19,50 µl x (n + 1)	0,50 µl x (n+1)

2.3 ANÁLISIS DE LOS DATOS DE VALORACIÓN DE LAS MUTACIONES

Una vez completada la serie, debe analizar los datos con el siguiente procedimiento.

Configuración del análisis del software

1. Utilice el software Rotor-Gene Q (2.3) para abrir el archivo adecuado.
2. Si no se ha introducido el nombre de las muestras antes de realizar la serie, haga clic en “Edit Samples” (Editar muestras).
3. Introduzca los nombres de las muestras en la columna “Name” (Nombre). Nota: deje en blanco los nombres de los pocillos vacíos.
4. Haga clic en “Analysis” (Análisis). En la página de análisis, haga clic en “Cycling A, Yellow” (Ciclado A, amarillo) para comprobar el canal HEX.
5. Compruebe que la opción “Dynamic Tube” (Tubo dinámico) está resaltada. Haga clic en “Slope Correct” (Pendiente correcta) y “Linear Scale” (Escala lineal).
6. Haga clic en “Take Off Adj.” (Ajuste de inicio) e introduzca los valores “15.01” y “20.01”
7. Configure el umbral en 0,02 y compruebe los valores de CT de HEX.
8. En la página de análisis, haga clic en “Cycling A, Green” (Ciclado A, verde) para ver el canal FAM.

9. El tubo dinámico debe aparecer marcado. Haga clic en “Slope Correct” (Pendiente correcta) y “Linear Scale” (Escala lineal).

10. Configure el umbral en 0,075 y compruebe los valores de CT de FAM.

2.4 ANÁLISIS DE CONTROL DE LA SERIE

Una vez finalizada la serie, debe analizar los datos tal como se indica a continuación.

- ✓ Control negativo: para garantizar que el molde no está contaminado, el NTC no debe generar un valor de CT en el canal verde (FAM) por debajo de 40. Para garantizar que la serie está configurada correctamente, el NTC debe mostrar una amplificación de 29,85 a 35,84 en el canal amarillo (HEX) (control interno). La serie no es válida si existe amplificación positiva en el canal verde y/o una amplificación fuera del intervalo de 29,85 a 35,84 en el canal amarillo.
- ✓ Control positivo: el control positivo (PC) de EGFR debe generar un valor de CT para cada muestra de reacción dentro del intervalo que se indica en la tabla 5 (incluidos los valores especificados). Una serie con un valor de control positivo fuera de este intervalo indica un problema de configuración en el ensayo, por lo que la serie debe señalarse como errónea. Si el control positivo genera un valor de CT dentro del intervalo (FAM), pero el valor de CT del control interno (HEX) se encuentra fuera del intervalo de 29,85 a 35,84, puede continuar con el análisis. Nota: no deben utilizarse los datos de las muestras si falla el control negativo o positivo.

Control de reacción	Ensayo	Canal	Intervalo de C _T
Control positivo	Control	Verde (FAM)	28,13-34,59
	T790M	Verde (FAM)	30,22-34,98
	Deleciones	Verde (FAM)	28,90-34,90
	L858R	Verde (FAM)	29,97-34,81
Control sin molde	Las 8 mezclas de reacción	Verde (FAM)	≥ 40,00
		Amarillo (HEX)	29,85-35,84

RESULTADOS

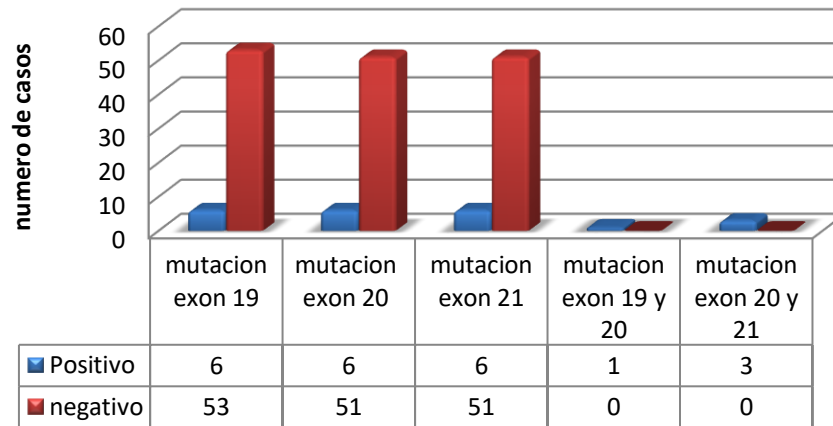
Hemos analizado un total de 60 pacientes, de los cuales 22 (36,6%) resultaron positivos para algunas de las mutaciones. De los cuales, seis (6) pacientes presentaron una sola mutación para la delección en el exón 19 (27.2%), adicional, seis (6) pacientes positivos en solamente para la mutación para la sustitución de los exones 20 (T790M) que corresponde al (27.2%) y 6 paciente positivo para una mutación de la sustitución en el exón 21 (L858R) que corresponde (27.2%). Por otra parte hubo pacientes que poseían 2 mutaciones diferentes en el gen EGFR, uno (1) positivo para las mutaciones en el exón 19 y 20, otros tres (3) salieron positivo para las mutaciones en el exón 20 y 21 (Ver grafica N°1).

Adicional del total de 60 pacientes, 36 fueron pacientes femeninas y 24 pacientes masculinos. (Ver grafica N°2). De los pacientes femeninos 15 resultaron positivos para alguna de las mutaciones (62.5%) y 21 pacientes femeninas sin mutación (58.3%) ver grafico N°3; de los cuales tres (3) de ellas resultó positiva para doble de las mutaciones (sustitución de los exones 20 y 21) y una (1) de ellas también resulto positiva para doble mutaciones (mutación en el exón 19 y 20) Ver grafica N°4.

Por otra parte del total de 24 pacientes masculinos de los cuales 7 (29.1%) pacientes resultaron positivos para una de las mutaciones y 17 pacientes sin mutación (70.8%), cabe mencionar que para los pacientes masculinos no hubo doble mutaciones positivas. Ver grafica N°5.

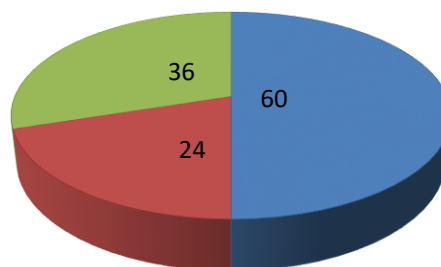
Otro aspecto importante estudiado fue el de ser fumador o no, en el cual de los 60 pacientes estudiados 19 (31.6%) eran fumadores y 41 (68.3%) no fumadores (ver grafica 6), de los cuales de los fumadores 5 (26.3%) resultaron positivos para una mutación y 14 fumadores sin mutación. Adicional de los pacientes no fumadores hubo un total de 16 (39.0%) positivos para las mutaciones y de ellos 4 (25%) con doble mutación. Ver grafica N°7.

Grafica 1. Casos positivos y negativos por mutacion

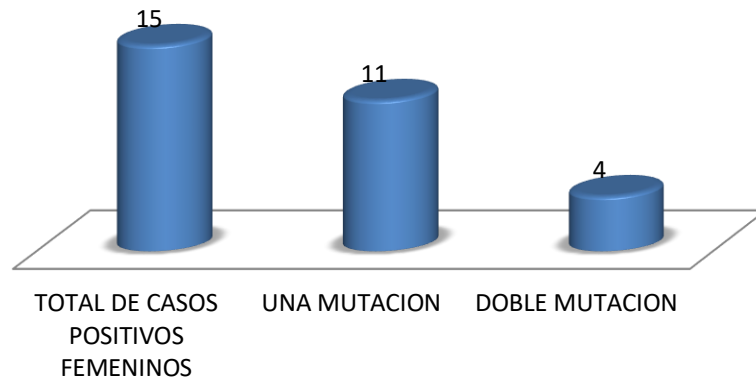


GRAFICA 2. TOTAL DE CASOS POR SEXO

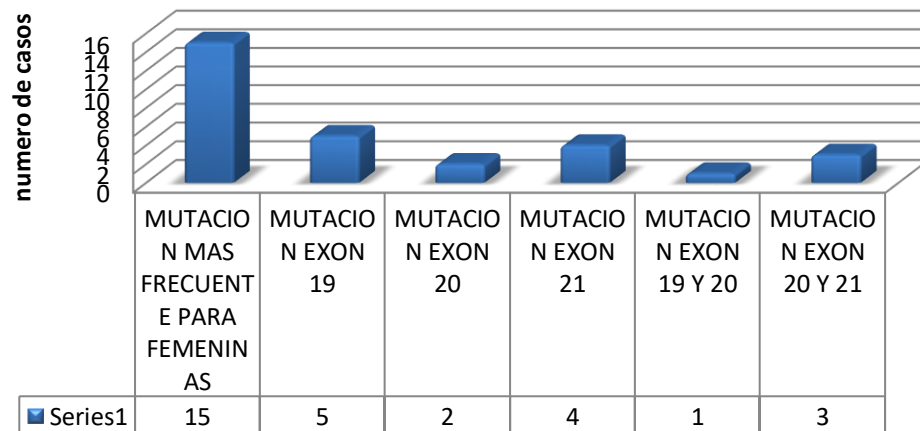
■ TOTAL DE CASOS ■ MASCULINO ■ FEMENINO



GRAFICA 3. PACIENTES FEMENINAS Y CANTIDAD DE MUTACIONES

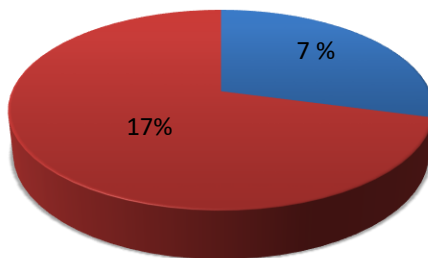


GRAFICA N°4. MUTACIONES MAS FRECUENTES EN PACIENTES FEMENINAS

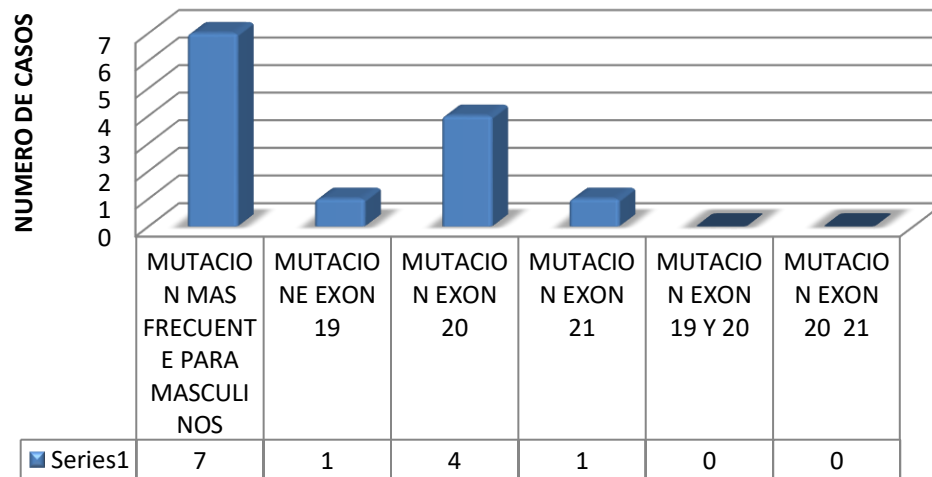


GRAFICA 5. PACIENTES MASCULINOS Y CANTIDAD DE MUTACIONES

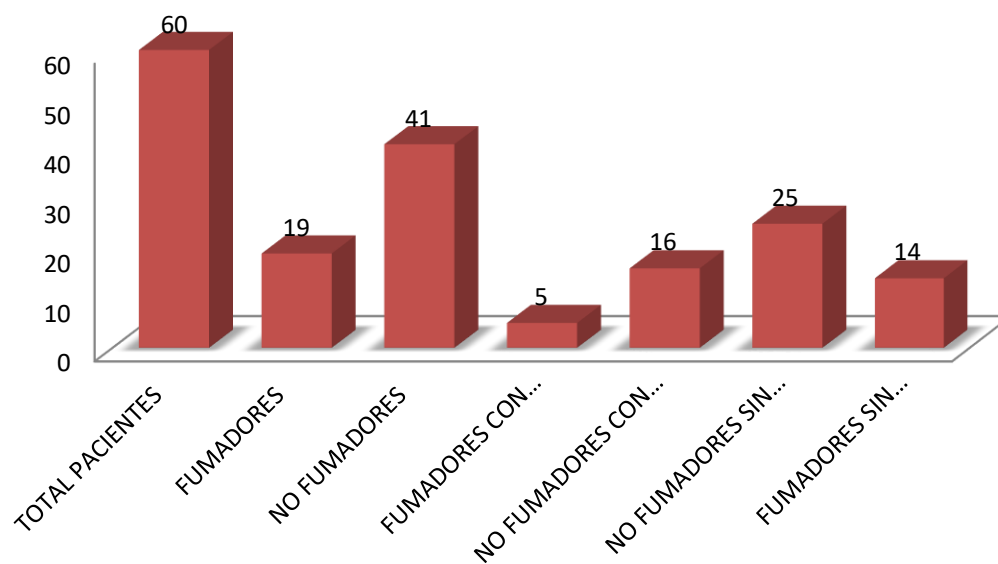
■ POSITIVO ■ NEGATIVO



GRAFICA N°6. MUTACIONES MAS FRECUENTES EN PACIENTES MASCULINOS



GRAFICA N°7. CORRELACION ENTRE HABITO DE FUMAR Y PRESENCIA DE MUTACIONES.



DISCUSION

- En nuestro estudio obtuvimos un total 16 casos (26.6%) de pacientes positivos que coincide con lo encontrado en el estudio de Ortiz,2013 en la que tenia una frecuencia del 20% en la mutación del gen del EGFR y con mayor frecuencia en mujeres y en no fumadores, con histología de adenocarcinoma.
- Otro aspecto importante que señalar y al comparar con lo encontrado por Ortiz,2013 fue en las mutaciones mas comunes, ellos obtuvieron un 14.3% para las deleciones en el exón 19 mientras que a nosotros fue 27.2% y la mutación L858R ellos obtuvieron un 6.7% mientras que nosotros de un 27.2%, esto pone en evidencia que una frecuencia alta de estas mutaciones en pacientes diagnosticados con adenocarcinoma.
- Tausa, 2011 cito en su estudio que la aparicion de las mutaciones de resistencia T790M están fuertemente relacionadas con la deleción del exón 19(sensibilidad) y que los pacientes que los presentan son menos sensibles al tratamiento con inhibidores tirosina kinasas, lo que correlaciona que en nuestro estudio que se obtuvo 4 pacientes y todas ellas fallecieron.
- deEn nuestro estudio hubo mayor casos de mutaciones positivas en mujeres con un 62.5%(15 pacientes) lo que es contraindicatorio con lo que indica NIH,2019 en la que señala que es mas común en hombres que en mujeres, pero cabe recalcar que en estudios como el de Izquierdo,2006 ; señala que la frecuencia en mujeres esta

cambiando durante estos últimos años debido a múltiples factores ambientales y hábitos de fumar.

- En cuanto al ser fumador y la presencia de adenocarcinoma, en nuestros pacientes las mujeres eran menos fumadoras en comparación a los hombres con lo que se asemeja a lo encontrado por Esteban,2018 en su estudio.
- Adicional señalan que el cáncer de pulmón en las personas que no fuman puede ser causado por exposición al radón, humo de segunda mano, cocinar en fogón, las exposiciones al asbesto, contaminación del aire, productos de la combustión del diesel o ciertos otros químicos también pueden causar cánceres de pulmón en algunas personas que no fuman.
- Según la Organización Panamericana de la salud;2019, un pequeño número de cánceres de pulmón ocurre en personas que no tienen ningún factor de riesgo conocido de esta enfermedad; algunos de estos casos podrían simplemente ser eventos aleatorios que no tienen una causa externa, o pueden deberse a factores que aún se desconocen. A menudo, los cánceres de pulmón en las personas que no fuman son en cierta forma diferentes de los que ocurren en las personas que fuman, suelen ocurrir a una edad más temprana.
- Los resultados también nos muestran que la biopsia líquida es una herramienta útil en el cáncer de pulmón no microcítico cuando no es posible el análisis tisular o la rebiopsia. La técnica permite la monitorización de la progresión de la enfermedad a lo largo del tiempo, y nuestros resultados avalan la técnica como un método

diagnostico de rutina ya que evita la repetición de pruebas invasivas y ayuda a la toma de decisiones clínicas y terapéuticas.

- Según la información expuesta en este estudio podemos recalcar que el ADN también puede afectar nuestro riesgo de padecer ciertas enfermedades, como lo son algunos tipos de cáncer, algunas personas heredan mutaciones del ADN de sus padres, lo cual incrementa considerablemente el riesgo de padecer ciertos cánceres. Sin embargo, no se cree que las mutaciones hereditarias por sí solas causen muchos de los cánceres de pulmón.
- Según Linderman; 2017; menciona que los genes parecen desempeñar un papel importante en algunas familias con un historial de cáncer de pulmón, algunas personas heredan una capacidad reducida de eliminar ciertos tipos de químicos en el cuerpo que causan cáncer, tal como los que se encuentran en el humo del tabaco. Esto puede ocasionar que tengan un mayor riesgo de cáncer de pulmón.

CONCLUSIONES

Tras los resultados de nuestro estudio podemos concluir que:

- La mutación T790M (exón 20) es la alteración genómica de EGFR mas frecuente y el que tiene mecanismo de resistencia a tratamiento con inhibidores tirosina kinasa en la mayoría de los pacientes y asociado a otras mutaciones como la delección exón 19 y exon 21 (L858R) .
- La frecuencia de las mutaciones en EGFR en pacientes mujeres con cáncer de pulmón no microcítico fue de mas alta en comparación con los pacientes masculinos.
- La frecuencia de las mutaciones en EGFR en pacientes no fumadores con cáncer de pulmón no microcítico fue alta en comparación a los fumadores.
- La biopsia liquida es una herramienta útil en la determinación de mutaciones de sensibilidad y de resistencia en pacientes con mutaciones EGFR.

RECOMENDACIONES

- Existieron pacientes sin presencia de mutaciones en EGFR pero se recomienda estudios en el gen *KRAS*. Alrededor de 5% de los cánceres de pulmón no microcítico tienen un cambio en un gen llamado *ALK*. Este cambio se observa con más frecuencia en las personas que no fuman (o que fuman poco).
- Alrededor de 1% a 2% de los tipos de cáncer de pulmón no microcítico presentan un reordenamiento en el gen *ROS1*, *RET* y *BRAF* el cual puede provocar que el tumor responda a ciertos medicamentos de terapia dirigida.
- Por lo que recomendamos incluir en estudios posteriores las pruebas como NGS (secuenciación de nueva generación) para un diagnóstico más completo y personalizado.
- Concientizar a la población panameña que no solo el fumar promueve la aparición de cáncer de pulmón, sino que son diferentes factores que permiten que este tipo de cáncer sea uno de los más mortales.

BIBLIOGRAFIA

- ACS. (2017). *american cancer society*. Recuperado el 10 de noviembre de 2018, de acerca del cancer de pulmon no microcitico:
<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-pulmon-no-microcitico/acerca/que-es-cancer-de-pulmon-no-microcitico.html>
- Alberg, A. J., Brock, M. V., Ford, J. G., Samet, J. M., & Spivack, S. D. (2013). Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 143(5 SUPPL), 1–29. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2345>
- Cappuzzo, F., Hirsch, F. R., Rossi, E., Bartolini, S., Ceresoli, G. L., Bemis, L., ... Varella-Garcia, M. (2005). Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(9), 643–655. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji112>
- Duan, H., Lu, J., Lu, T., Gao, J., Zhang, J., Xu, Y., ... Liu, T. (2015). Comparison of EGFR mutation status between plasma and tumor tissue in non-small cell lung cancer using the Scorpion ARMS method and the possible prognostic significance of plasma EGFR mutation status. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(10), 13136–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26722512>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4680457>

- Jemal, Siegel, Ward, Hao, Xu, & Thun.(2009).Cancer statistics, california.
- García-Foncillas, J., Garridob, P., Gómezc, J., Palaciosd, J., & Taróne, M. (2011). Recomendaciones para la determinacion de las mutaciones del gen EGFR en el carcinoma de pulmon no microcitico. *Revista Espanola de Patologia*, 44(1), 17–31. <https://doi.org/10.1016/j.patol.2011.02.003>
- Instituto Nacional de Estadistica y censo, Contraloria General de la republica de Panama.recuperado el 3de noviembre 2018, de <https://www.contraloria.gob.pa/inec/>
- Linderman, N., Cagle, P., & Beasley, M. (2013). Molecular testing guideline for selection of lung cancer patient for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the college of american pathologists, international association for the study of lung cancer, and association for molecular pathol. *arch Pathol Lab Med* , 137, 828-60.
- Lodish, H. (2005). *Biologia celular y molecular*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- NIH, I. N. (25 de septiembre de 2018). *Instituto Nacional del cancer*. Recuperado el 1 de noviembre de 2018, de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/pulmon/pro/tratamiento-pulmon-celulas-no-pequenas-pdq>
- Nishio, M., Goto, K., Chikamori, K., Hida, T., Katakami, N., Maemondo, M., ... Tamura, T. (2016). Analysis of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in

Serum

- OMS, O. m. (2003). *Convenio Marco de la OMS para el control del tabaco*.
Obtenido de http://www.who.int/fctc/text_download/es/index.html.
- OPS, O. P. (2010). *El consumo de cigarrillos y sus efectos en la salud*. Baltimore, USA.
- Paez, J. G., Janne, P. A., Lee, J. C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., ... Jänne, P. a. (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5676), 1497–1500.
<https://doi.org/10.1126/science.1099314>
- Pao, Willian. (2004). las mutaciones del gen del receptor de EGF son comunes en los canceres de pulmon de nunca fumadores y se asocia con la sensibilidad de los tumores a gefitinib y erlotinib. *Proceeding of the national academy of science of the united states of america*. USA.101(36),1306-1313.
- Pcr, R. G., & Handbook, K. (2012). *Sample & Assay Technologies QIAGEN*
Sample and Assay Technologies, 24(4501263).
- Qiu, M., Wang, J., Xu, Y., Ding, X., Li, M., Jiang, F., ... Yin, R. (2015).
Circulating Tumor DNA Is Effective for the Detection of EGFR Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 24(1), 206–212. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0895>
- Shepard, Frances. (2005). Erlotinib in previously treated non small cell lung cancer: the new england journal of medicine.vol 353.2 pag.123-132.

- Tseng, J. Sen, Wang, C. L., Huang, M. S., Chen, C. Y., Chang, C. Y., Yang, T. Y., ... Chang, G. C. (2014). Impact of EGFR mutation detection methods on the efficacy of erlotinib in patients with advanced EGFR-wild type lung adenocarcinoma. *PLoS ONE*, 9(9), 1–9.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107160>
- Xu, F., Wu, J., Xue, C., Zhao, Y., Jiang, W., Lin, L., ... Zhang, L. (2012). Comparison of different methods for detecting epidermal growth factor receptor mutations in peripheral blood and tumor tissue of non-small cell lung cancer as a predictor of response to gefitinib. *OncoTargets and Therapy*, 5, 439–47.
<https://doi.org/10.2147/OTT.S37289>
- Zhao, J., Feng, H., Zhao, J., Liu, L., Xie, F., Xu, Y., ... Wang, M. (2016). A sensitive and practical method to detect the T790M mutation in the epidermal growth factor receptor. *Oncology Letters*, 2573–2579.
<https://doi.org/10.3892/ol.2016.4263>